

Морфологические аспекты применения полусинтетического антиоксиданта диборнола при инволюционной центральной хориоретинальной дегенерации у крыс линии OXYS

Жданкина А.А.¹, Плотников М.Б.², Смольякова В.И.², Иванов И.С.², Колосова Н.Г.³, Фурсова А.Ж.³, Кучин А.В.⁴, Чукичева И.Ю.⁴, Логвинов С.В.¹

Morphological aspects used of semisynthetic antioxidant dibornol in treatment of rats OXYS with involutinal central chorioretinal degeneration

Zhdankina A.A., Plotnikov M.B., Smoliyakova V.I., Ivanov I.S., Kolosova N.G., Fursova A.Zh., Kuchin A.V., Chukicheva I.Yu., Logvinov S.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

³ НИИ цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

⁴ Институт химии Коми НЦ Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар

© Жданкина А.А., Плотников М.Б., Смольякова В.И. и др.

Изучены сетчатки глаз крыс *oxys* в возрасте 6 мес на фоне коррекции 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом (диборнолом). У крыс *oxys* преобладают сосудистые нарушения – снижение числа открытых функционирующих сосудов хориоидеи, деструктивные изменения пигментного эпителия и нейронов сетчатки. Показан ретинопротекторный эффект диборнола, выражающийся в увеличении площади открытых сосудов, снижении площади тромбированных сосудов и высокой сохранности нейронов сетчатки крыс *oxys*.

Ключевые слова: морфология сетчатки, центральная хориоретинальная дегенерация, крысы *oxys*, диборнол.

Retina of rats OXYS 6 months of age by treatment of 4-methyl-2,6-diisobornylphenol (dibornol) was researched. Mainly, rats OXYS have of vascular disturbances such as reduction open functional vasculars of choroidea, destruction of retinal pigmental epithelium and retinal neurons. Dibornol was protected of retina increased area of open vascular and safety of retinal neurons. Besides dibornol was prevented thrombosis in retinal vasculars.

Key words: morphological of retina, central chorioretinal degeneration, OXYS, dibornol.

УДК 617.735-007.17-092.9:615.014.425:599.32.4

Введение

Инволюционная центральная хориоретинальная дистрофия (ИЦХРД) – одна из важнейших причин снижения зрения в зрелом и старческом возрасте. По официальным данным Центра по профилактике устранимой слепоты Всемирной организации здравоохранения, распространен-

ность этой патологии составляет 300 случаев на 100 тыс. населения [7, 8]. Заболевание представляет собой двусторонний хронический дистрофический процесс с преимущественным поражением хориокапиллярного слоя хориоидеи, стекловидной мембраны Бруха и слоя пигментного эпителия сетчатки, что ведет к снижению и потере зрительных функций [1, 4, 6, 14]. В по-

следнее время ИЦХРД диагностируется не только в пожилом, но и в молодом возрасте, что приводит к первичной инвалидности в 11% случаев у лиц трудоспособного возраста, а у пожилых — в 28% случаев [7]. В патогенезе рассматриваемой патологии доказана роль свободнорадикальных реакций. Кроме того, известно, что с возрастом происходит снижение общей антиокислительной активности и антирадикальной активности крови, что приводит к дисбалансу различных показателей проокислительной и антиокислительной систем [14]. Уникальные возможности для выяснения патогенеза ИЦХРД, оценки эффективности новых способов терапевтических воздействий открывает использование генетической модели преждевременного старения — линии крыс *oxys* [5].

Лечение больных ИЦХРД остается сложной, а подчас и далекой от положительного решения проблемой современной офтальмологии [2, 9]. Патогенетически обоснованным в лечении макулярной дегенерации сетчатки является применение препаратов, обладающих антиоксидантными, антигипоксантными, антиагрегантными свойствами.

Доказано, что синтетические соединения на основе экранированных фенолов по своим антиоксидантным свойствам зачастую превосходят природные антиоксиданты. Они способствуют уменьшению скорости перекисного окисления липидов и белков, а также обладают антигипоксической и гемореологической активностью и являются перспективными средствами терапии свободнорадикальных патологий [3, 10, 11].

Цель настоящего исследования — изучить влияние полусинтетического антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (диборнола) на структурные изменения сетчатки при хориоретинальной дегенерации в эксперименте.

Материал и методы

Исследована инволюционная центральная хориоретинальная дегенерация, адекватной моделью которой служили крысы линии *oxys* [5].

Эксперименты выполнены на 30 крысах *oxys* в возрасте 6 мес, полученных из лаборатории разведения животных НИИ цитологии и генети-

ки СО РАН (г. Новосибирск), из которых 15 животных опытной группы в течение 1,5 мес получали диборнол в дозе 100 мг/кг массы тела. Крысы получали препарат перед едой на сухарике стандартного размера, крысы контрольной группы (15 особей) — только сухарик. Интактным контролем служили 10 крыс линии Вистар того же возраста. Взятие материала осуществляли сразу после окончания эксперимента.

Материалом исследования являлись сетчатки глаз экспериментальных животных. Крыс декапитировали под эфирным наркозом, центральные участки задней стенки глаз фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида на какодилатном буфере с концентрацией 0,2 моль (рН = 7,4), постфиксировали в 2%-м растворе четырехоксида осмия и заливали в смесь смол эпон-аралдит. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A (Япония). На полутонких срезах определяли содержание (в процентах) нейросенсорных клеток с пикноморфными ядрами, пикноморфных радиальных глиоцитов. С помощью окулярной измерительной сетки Автандилова высчитывали удельную площадь сосудов хориоидеи — открытых и с явлениями сладжа, стаза и тромбоза.

Статистическая обработка результатов проведена при помощи программы Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — выборочное среднее значение, m — ошибка среднего.

Результаты

В контрольной группе животных наиболее выраженные изменения наблюдались со стороны сосудов хориоидеи и гематоретинального барьера. В некоторых хориокапиллярах просвет был резко сужен за счет выбухания в него цитоплазмы или ядросодержащей части эндотелиоцитов, многие характеризовались расширени-

ем просвета. Наблюдались явления стаза и сладжа форменных элементов (рис. 1). Нередко встречались тромбированные сосуды. Структурные изменения эндотелиоцитов — первой составляющей гематоретинального барьера сетчатки — характеризовались снижением электронной плотности цитоплазмы, уменьшением содержания органелл, появлением деформированных и пикнотичных ядер (рис. 2). В окружающей соединительной ткани встречались отложения липофусцина — друзы, характерные, по классификации Л.А. Кацнельсон [4], для неэкссудативной стадии хориоретинальной дегенерации, а также наблюдалась миграция мононуклеарных фагоцитов и тканевых базофилов (рис. 3). Морфоколичественный анализ сетчаток показал, что у крыс линии *oxys* происходит достоверное снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов и увеличение

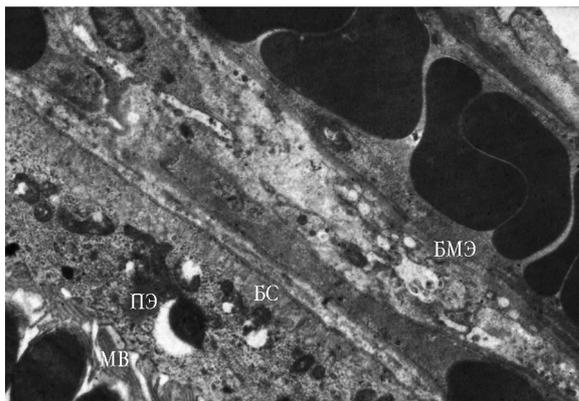


Рис. 1. Стаз эритроцитов в хориокапилляре крыс *oxys* в возрасте 6 мес. БМЭ — базальная мембрана эндотелия, БС — базальная складчатость, МВ — микроворсинки; ПЭ — пигментный эпителий. Утолщение базальной мембраны эндотелия. Сглаженность базальной складчатости и деструкция микроворсинок пигментного эпителия.
Ультратонкий срез. Ув. 4 800

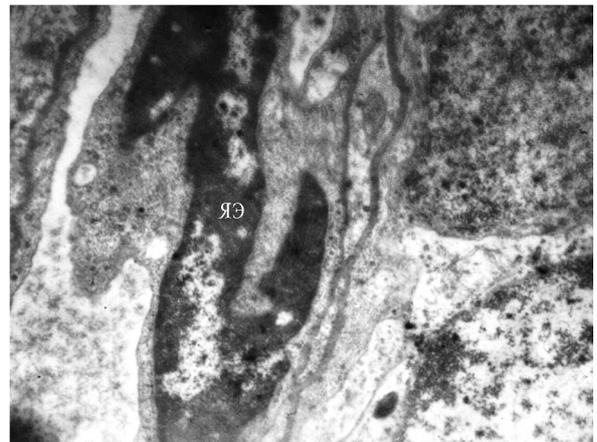


Рис. 2. Изменение структуры и формы ядра эндотелиоцита стенки интравитреального сосуда крыс линии *oxys* в возрасте 6 мес. ЯЭ — ядро эндотелиоцита. Ув. 5 500

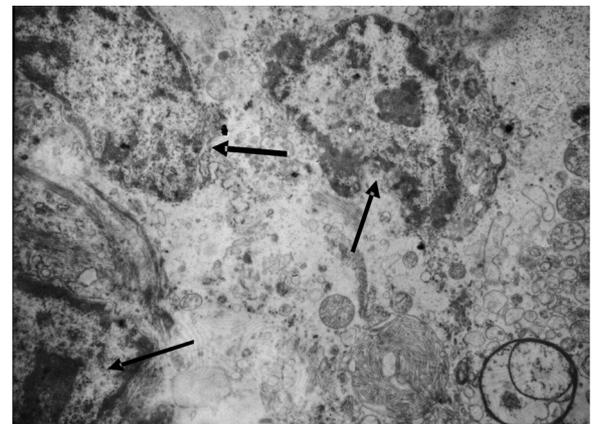


Рис. 3. Миграция макрофагов (стрелки) из кровеносного русла в субретинальное пространство крыс *oxys* в возрасте 6 мес. Ультратонкий срез. Ув. 4 000

удельной площади сосудов со стазом и сладжем форменных элементов по отношению к крысам Вистар в 16,7 раза ($p < 0,05$). Курсовое введение диборнола оказывало положительный эффект на состояние сосудов хориоидеи у крыс *oxys*, что на уровне количественного анализа выражалось в достоверном увеличении удельной площади открытых функционирующих сосудов в 2 раза и снижении сосудов со сладжем и тромбозом в 5 раз (табл. 1).

Таблица 1

Количественный анализ удельной площади сосудов хориоидеи сетчатки крыс исследуемых групп в возрасте 6 мес

Группа	Открытые сосуды, %	Сосуды со стазом и сладжем, %
--------	--------------------	-------------------------------

Вистар	36,0 ± 0,7	1,5 ± 0,1
охYS	14,4 ± 0,9*	25,1 ± 1,9*
охYS + диборнол	29,4 ± 2,0**	5,0 ± 1,2**

* Уровень статистической значимости различий ($p_1 < 0,05$) при сравнении с показателями у крыс Вистар.

** Уровень статистической значимости различий ($p_2 < 0,05$) между группами животных опытной и контрольной групп.

При электронно-микроскопическом исследовании сетчаток контрольных крыс охYS выявлены значительные изменения базального комплекса и пигментного эпителия сетчатки, составляющих наряду с эндотелием хориокапилляров наружный гематоретинальный барьер. Базальный комплекс характеризовался неравномерным утолщением из-за локальной пролиферации и отека волокнистого компонента (рис. 4).

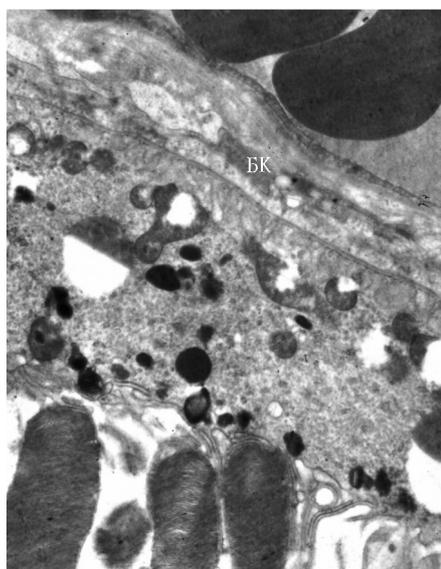


Рис. 4. Неравномерное утолщение, разволокнение и отек базального комплекса сетчатки крыс охYS в возрасте 6 мес. БК — базальный комплекс. Ультратонкий срез. Ув. 5 800

Цитоплазма большинства клеток пигментного эпителия была резко вакуолизирована, наблюдались деструкция микроворсинок и исчезновение базальной складчатости. Удельная площадь пигментного эпителия снижена относительно контрольных значений на 34,4% (контроль $(5,4 \pm 0,1)\%$, $p < 0,05$). Введение диборнола приводило к увеличению функциональной активности пигментного эпителия, что выражалось в гипертрофии микроворсинок, активном захвате обрабо-

танных мембранных дисков наружных сегментов нейросенсорных клеток, усилении базальной складчатости, однако удельная площадь пигментного эпителия достоверно не изменялась.

Радиальные глиоциты сетчатки крыс охYS подвергались в основном дегенерации: наблюдались повышение электронной плотности глиоплазмы и ядра, деструктивные изменения оргanelл и кариопикноз. Морфоколичественный анализ выявил достоверное увеличение количества пикноморфных радиальных глиоцитов в 8,5 раза по сравнению со значениями у крыс линии Вистар $((1,1 \pm 0,1)\%$, $p < 0,05$). Однако наряду с ярко выраженными альтеративными процессами отмечались и прогрессивно-пролиферативные реакции, о чем свидетельствовала выраженная пролиферация склеральных отростков радиальной глии в наружном ядерном слое (рис. 5). Введение диборнола снижает деструкцию мюллеровских глиоцитов, приводя к трехкратному снижению числа пикноморфных клеток ($p < 0,05$).

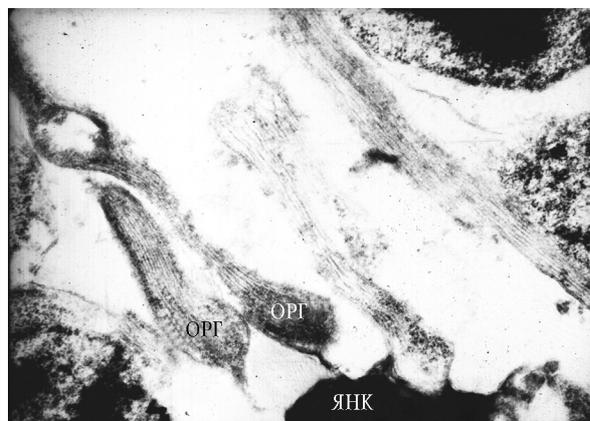


Рис. 5. Пролiferация склеральных отростков радиальной глии и фагоцитоз ими деструктивно измененных перикарионов нейросенсорных клеток крыс охYS в возрасте 6 мес. ОРГ — отростки радиальных глиоцитов, ЯНК — ядро нейросенсорной клетки. Ультратонкий срез. Ув. 5 000

Из трех разновидностей нейронов сетчатки глаз наиболее поражаемыми у крыс линии охYS в возрасте 6 мес оказались нейросенсорные клетки.

Изменение нейросенсорных клеток проявлялось главным образом деструкцией наружных сегментов — расслоением, фрагментацией, ваку-

ольной дегенерацией, потерей связи с пигментно-эпителиоцитами. Со стороны внутренних сегментов отмечаются деструктивные процессы внутренних и наружных мембран митохондрий. Количественный анализ выявил увеличение числа пикнотичных ядер фоторецепторов в 3,5 раза по отношению к аналогичным значениям крыс Вистар ($p < 0,05$). Диборнол способствовал снижению деструктивных изменений нейросенсорных клеток, приводя исследуемый показатель до значений, зарегистрированных у крыс Вистар (табл. 2).

Таблица 2
Содержание нейросенсорных клеток с пикнозом ядра в наружном ядерном слое сетчатки крыс исследуемых групп в возрасте 6 мес

Группа	Пикноз нейросенсорных клеток, %
Вистар	0,4 ± 0,02
oxys	1,5 ± 0,3
oxys + диборнол	0,4 ± 0,1*

* Уровень статистической значимости различий ($p < 0,05$) между группами животных опытной и контрольной групп.

Обсуждение

Согласно свободнорадикальной теории старения, в его патогенезе и развитии связанных с ним заболеваний ключевую роль играет окислительный стресс — нарушение баланса в системах генерации и элиминации активных форм кислорода [14]. Накопление окислительных повреждений макромолекул и снижение эффективности работы защитных механизмов у крыс линии oxys способствуют развитию деструктивных изменений в сетчатке, отличающейся повышенным содержанием кислорода и легкоокисляемых субстратов. Настоящее исследование показало, что у крыс oxys в возрасте 6 мес имеются значительные нарушения в структуре пигментного эпителия, эндотелия капилляров, мембраны Бруха, увеличение площади сосудов со стазом и сладжем форменных элементов, что во многом способствует развитию гипоксии, нарушению кровоснабжения сетчатки и развитию процессов неоваскулогенеза — ключевых факторов формирования инволюционной хориоретинальной дегенерации [12]. Отмечены также деструктивные изменения нейросенсорных клеток,

которые, вероятно, являются, с одной стороны, следствием гипоксии и снижения функциональной активности пигментного эпителия, с другой — насыщенность мембран наружных сегментов нейросенсорных клеток легкоокисляющимися липидами (до 50% полиненасыщенных жирных кислот) создает предпосылки для развития в них окислительного стресса [13].

Диборнол способствует существенному снижению дегенерации нейросенсорных клеток, что объясняется, скорее всего, двумя механизмами — прямым, через проявление антиоксидантных свойств, и опосредованным, через проявление гемореологической, антигипоксической активностей [3, 11] и, как следствие, улучшение кровоснабжения сетчатки, глионейрональных взаимодействий, увеличение функциональной активности пигментного эпителия, снижение деструкции радиальной глии.

Заключение

Выраженный ретинопротекторный эффект 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в эксперименте на ранних стадиях развития такого социально значимого заболевания, как инволюционная центральная хориоретинальная дегенерация, открывает широкие перспективы использования препарата в качестве профилактического и лечебного средства свободнорадикальных патологий в офтальмологии.

Литература

1. Будзинская М.В., Гурова И.В. Субретинальная неоваскулярная мембрана при возрастной макулярной дегенерации // Вестн. офтальмологии. 2006. № 4. С.49—54.
2. Иванишко Ю.А., Лотошников М.А., Зарезина Е.А. Возрастные поражения макулы: «естественное» течение, попытка классификации, возможности превентивного лечения. Ростов н/Д: «Макула 2006», 2006. С. 107—113.
3. Иванов И.С., Смольякова В.И. Влияние производного о-изоборнилфенола на показатели перекисного окисления липидов в тканях головного мозга при ишемии у крыс // Науки о человеке: материалы IX конгр. моло-

Жданкина А.А., Плотников М.Б., Смольякова В.И. и др. Морфологические аспекты применения... диборнола...

4. дых ученых и специалистов. Томск: СибГМУ, 2008. С. 111–112.
5. *Кацнельсон Л.А.* Сосудистые заболевания глаз. М.: Медицина, 1990. 268 с.
6. *Колосова Н., Лебедев П., Фурсова А.* Преждевременно стареющие крысы *oxys* как модель сенильной катаракты человека // Успехи геронтологии. 2003. Т. 12. С. 143–148.
7. *Кравчук Е.А.* Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз // Вестн. офтальмологии. 2004. № 5. С. 48–51.
8. *Либман Е.С., Шахова Е.В.* Слепота, слабовидение и инвалидность по зрению в Российской Федерации // Ликвидация устранимой слепоты. Всемирная инициатива ВОЗ: материалы Рос. межрегион. симпозиума. Уфа, 2003. С. 38–42.
9. *Майчук Ю.Ф.* Принципы Всемирной инициативы ВОЗ по ликвидации устранимой слепоты. Возможные пути их использования в Российской Федерации // Окулист. 2003. Т. 44. № 4. С. 5–8.
10. *Максимов И.Б.* Инволюционные центральные хориоретинальные дистрофии: применение пептидных биорегуляторов в комплексном лечении. СПб., 2001. 88 с.
11. *Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С. и др.* Гемореологическая активность производных о-изоборнилфенола // Гемореология и микроциркуляция: Материалы междунар. конф. Ярославль: Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. 2007. С. 160.
12. *Озерова И.Б.* Новые антиоксиданты — экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы *in vivo* и *in vitro*. Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: Ин-т биохим. физики им. Н.М. Эммануэля РАН. 2000. 25 с.
13. *Bhutto I., McLeod D., Hasegawa T., Kim S. et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroids and eyes with age-related macular degeneration // Exp. Eye. Res. 2006. № 82. P. 99–110.
14. *Binder S., Stanzel V., Krebs I. et al.* Transplantation of the RPE in AMD // Prog. Retin. Eye. Res. 2007. № 5. P. 516–54.
15. *Harman D.* The aging process // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. № 78. P. 7124–7128.

Поступила в редакцию 11.03.2009 г.

Утверждена к печати 17.06.2009 г.

Сведения об авторах

А.А. Жданкина — канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

М.Б. Плотников — д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией фармакологии кровообращения НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

В.И. Смольякова — канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

И.С. Иванов — аспирант НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

Н.Г. Колосова — д-р биол. наук, зав. сект. геномной и постгеномной фармакологии НИИ цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

А.Ж. Фурсова — канд. мед. наук, зав. отделением микрохирургии глаза Новосибирской областной клинической больницы, научный сотрудник НИИ цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

А.В. Кучин — д-р хим. наук, член-корреспондент РАН, директор Института химии Коми НЦ Уральского отделения РАН (г. Сыктывкар).

И.В. Чукичева — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник Института химии Коми НЦ уральского отделения РАН (г. Сыктывкар).

С.В. Логвинов — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Жданкина Анна Александровна, тел. 8 (3822) 55-60-32, e-mail: ajd2@rambler.ru